

DAVID LEONARDO JUSTINICO CASTRO

**ADAPTAÇÕES MORFOFISIOLÓGICAS ENVOLVIDAS NA REGULAÇÃO DA
GLICOSE PLASMÁTICA NO MORCEGO NECTARÍVORO *Anoura caudifer*
(Geoffroy, 1818)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*

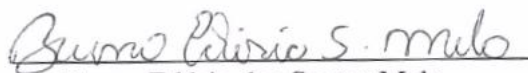
VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

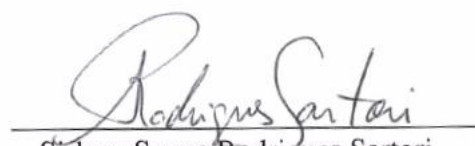
DAVID LEONARDO JUSTINICO CASTRO

**ADAPTAÇÕES MORFOFISIOLÓGICAS ENVOLVIDAS NA REGULAÇÃO DA
GLICOSE PLASMÁTICA NO MORCEGO NECTARÍVORO *Anoura caudifer*
(Geoffroy, 1818)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*

APROVADA: 6 de abril de 2018.


Bruno Edésio dos Santos Melo


Sirlene Souza Rodrigues Sartori
(Coorientadora)


Mariella Bontempo Duca de Freitas
(Orientadora)

Ficha de Catalogação e Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

J96a
2018

Justinico Castro, David Leonardo, 1986-
Adaptações morfofisiológicas envolvidas na regulação da glicose plasmática no morcego nectarívoro *Anoura caudifer* (Geoffroy, 1818) / David Leonardo Justinico Castro. - Viçosa, MG, 2018.
viii, 28 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Mariella Bontempo Duca de Freitas.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Morcegos - Morfologia. 2. Glicemia. 3. Pâncreas. 4. Morcegos - Exercícios. 5. Glicogênio. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Animal. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal. II. Título.

CDD 22. ed. 599.45

Dedicado a Deus
A meus amados pais Gonzalo e Ana Lucia
A meus queridos irmãos Diego, Oscar, Camilo e José
A meu sobrinho, o pequeno Daniel
E a todos meus bons amigos...

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre presente em todos os momentos de minha vida.

A minha mãe, pelo amor, carinho, incentivo, pelas orações e por compreender a minha longa ausência.

A meu pai, meus irmãos e minhas cunhadas pelo apoio durante esta caminhada, por ter ajudado em todos os processos para a concretização desta etapa de minha vida.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, Susana, Jerusa, Mariaurea, Stela, Ana Luiza, Renata, Barbara, Pedro, Isabela e Anaísa. Obrigado pela ajuda nas coletas e nos experimentos.

A Luís do Laboratório de Biologia Estrutural, obrigado pela parceria, amizade e ajuda na histologia.

Aos amigos e professores do Museu de Zoologia João Moojen, por ter compartilhado tantos momentos bons e “churrascos” durante minha estadia no Brasil.

A Esteban, Diego e Evaristo, pela parceria, por acompanhar nas saídas de campo.

A professora Dr^a. Mariella Bontempo Duca de Freitas, obrigado pela orientação e paciência, por ter acreditado no meu trabalho, por ter contribuído na minha formação profissional e pessoal.

A professora Dr^a. Gisele Lessa, pelo afetuoso recebimento no Brasil, pelos conselhos e ensinamentos e pela amizade.

As professoras Dr^a. Sirlene Sartori e Dr^a Fabiana de Melo pela coorientação, ensinamentos e sugestões em momentos de dúvidas e pela amizade.

Aos professores Dr^a. Regiane Gonçalves e Dr. Jorge Dergam, obrigado pelo empréstimo de equipamentos do laboratório.

A todo o pessoal administrativo do programa de Biologia Animal, pela indispensável ajuda.

Ao professor Dr. Carlos Magalhães do departamento de Fitotecnia, pela autorização das coletas nos Pomares- UFV.

A Universidade Federal de Viçosa e Departamento de Biologia Animal, por ter concedido a oportunidade para a realização deste mestrado.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

A todo o povo irmão deste país maravilhoso que chamamos Brasil, muito obrigado!

CONTEÚDO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	3
2.1. Captura de animais.....	3
2.2. Procedimentos experimentais	4
2.3. Dissecção e disposição dos tecidos.....	4
2.4. Determinação da insulina em plasma	5
2.5. Determinação da glicose em plasma.....	5
2.6. Determinação do glicogênio hepático e muscular	5
2.7. Análises de estresse oxidativo	5
2.7.1. Preparação das amostras	5
2.7.2. Catalase (CAT).....	6
2.7.3. Superóxido Dismutase (SOD)	6
2.7.4. Glutathione S-transferase (GST)	6
2.7.5. Óxido Nítrico (NO)	6
2.7.6. Determinação de produtos finais da lipoperoxidação.....	7
2.7.7. Quantificação de proteínas	7
2.8. Processamento histológico do pâncreas.....	7

2.8.1.	Morfometria das ilhotas pancreáticas	8
2.8.2.	Estereologia do pâncreas	8
2.9.	Análise estatística	10
3.	RESULTADOS	10
3.1.	Glicemia.....	10
3.2.	Insulina plasmática	11
3.3.	Glicogênio hepático e muscular.....	12
3.4.	Estresse oxidativo	14
3.5.	Morfometria e estereologia do pâncreas	17
3.5.1.	Morfologia geral	17
3.5.2.	Morfometria.....	18
3.5.3.	Estereologia	19
4.	DISCUSSÃO	19
5.	CONCLUSÃO.....	22
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

RESUMO

JUSTINICO-CASTRO, David Leonardo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2018. **Adaptações morfofisiológicas envolvidas na regulação da glicose plasmática no morcego nectarívoro *Anoura caudifer* (Geoffroy, 1818)**. Orientadora: Mariella Bontempo Duca de Freitas. Coorientadores: Sirlene Souza Rodrigues Sartori e Fabiana Cristina Silveira Alves de Melo

Morcegos nectarívoros, apesar de ingerirem grandes quantidades de néctar floral rico em carboidratos simples, não apresentam sintomas e consequências a longo prazo relacionados à hiperglicemia como outros mamíferos. Nestes animais, a alta atividade durante o voo parece fundamental para regular os altos níveis glicêmicos. No entanto, o papel da secreção de insulina nestes animais em repouso e após o exercício ainda não foi estudado. As reservas energéticas corporais de glicogênio e o efeito das espécies reativas de oxigênio (EROS), produto da auto-oxidação da glicose, também ainda não foram investigados. O presente estudo teve por objetivo investigar as adaptações morfofisiológicas envolvidas na regulação da glicose plasmática em morcegos nectarívoros (*Anoura caudifer*, E. Geoffroy, 1818). Um total de 35 morcegos foram separados em 3 grupos experimentais: Controle (água e repouso), repouso (dieta e repouso) e exercício (dieta e voo por 20 min). Em cada grupo, os animais foram eutanasiados após 0, 45 e 90 minutos (T0, T45 e T90) de uma dose oral de glicose (5,4 g / Kg de peso corporal) ou água. As concentrações de insulina no plasma foram baixas mesmo após 45 e 90 minutos da dose oral de glicose em repouso. O exercício teve um efeito significativo na diminuição da glicemia. As concentrações de glicogênio hepático e muscular não mudaram com o exercício. As análises morfométricas e estereológicas revelaram ilhotas pancreáticas com maior diâmetro ($79,8 \pm 1,43 \mu\text{m}$) e tecido endócrino (13%) em comparação com outros morcegos. Não houve efeito do exercício sobre a atividade das enzimas antioxidantes no músculo, mas houve aumento da concentração de óxido nítrico e da atividade da catalase nos rins. Os dados apresentados aqui indicam uma baixa capacidade de secreção de insulina em *A. caudifer*, o que é consistente com a capacidade limitada de armazenar e utilizar reservas de glicogênio, relatadas pela primeira vez neste estudo. As altas taxas metabólicas durante o exercício reportadas para esta espécie podem ser o principal mecanismo adaptativo para tolerar e regular os altos níveis de glicose plasmáticos, consequência de sua dieta rica em carboidratos.

ABSTRACT

JUSTINICO-CASTRO, David Leonardo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2018. **Morphophysiological adaptations involved in regulating blood glucose in the nectar-eating bat *Anoura caudifer* (Geoffroy, 1818).** Adviser: Mariella Bontempo Duca de Freitas. Co-advisers: Sirlene Souza Rodrigues Sartori and Fabiana Cristina Silveira Alves de Melo

Nectar-eating bats, despite ingesting large amounts of nectar, rich in simple carbohydrates, do not present symptoms and long-term consequences of hyperglycemia, as seen in other mammals. In these animals, high activity during flight seems to be important to regulate high glycemic levels. However, the role of insulin secretion in these animals at rest and after exercise has not yet been studied. Body energy reserves and the effect of reactive oxygen species (EROS), a product of glucose self-oxidation, have also not been investigated. The present study aimed at investigating morphophysiological adaptations involved in the regulation of plasma glucose in nectarivorous bats (*Anoura caudifer*, E. Geoffroy, 1818). A total of 35 bats were assorted into three experimental groups: Control (water and rest), rest (diet and rest) and exercise (diet and flight for 20 min). In each group, the animals were euthanized after 0, 45 and 90 minutes (T0, T45 and T90) of an oral dose of glucose (5.4 g / Kg body weight) or water. Insulin plasma concentrations were low even after 45 and 90 minutes of the oral glucose dose at rest. Exercise decreased blood glucose levels after 45 min of the glucose ingestion. The concentrations of hepatic and muscular glycogen did not change after 90 min, with exercise. Morphometric and stereological analyzes revealed pancreatic islets with a larger diameter ($79.8 \pm 1.43 \mu\text{m}$) and a high percentage of endocrine tissue (13%) compared to others bats. There was no effect of exercise on the activity of antioxidant enzymes in the muscle, but there was an increase in nitric oxide concentration and catalase activity in the kidneys. The data presented here indicate a low capacity for insulin secretion in *A. caudifer*, which is consistent with the limited capacity to store and utilize glycogen stores, first reported in this study. The high metabolic rates during exercise reported for this species may be the main adaptive mechanism to tolerate and regulate high levels of plasma glucose, a consequence of its high carbohydrate diet.

1. INTRODUÇÃO

Os morcegos (Ordem Chiroptera) formam a segunda maior ordem de mamíferos, possuem uma alta diversidade de espécies e apresentam uma ampla variedade de hábitos alimentares. Dentre os quirópteros, os morcegos nectarívoros (como *Anoura caudifer*), além de se alimentarem de uma fonte rica em energia, são conhecidos por apresentar altas taxas metabólicas específicas, considerando sua massa corporal (Voigt e Winter, 1999; Helversen e Winter, 2003). O néctar consiste de uma solução de açúcares simples, tais como glicose, frutose e sacarose, em concentrações de 30% ou mais (Ayala-Berdon et al. 2011; Baker et al. 2016).

Os morcegos nectarívoros geralmente ingerem grandes quantidades de carboidratos em um curto período de tempo; podendo consumir cerca de um quarto de sua massa corporal em néctar a cada noite (Helversen & Reyer, 1984). A assimilação destes açúcares é facilitada por uma série de adaptações no sistema digestório, como uma alta atividade da enzima sacarase no trato intestinal, a fim de hidrolisar a sacarose em glicose e frutose (Hernandez e Martinez Del Rio, 1992). Além disso, eles apresentam uma via de absorção intestinal de carboidratos predominantemente paracelular, aumentando a velocidade de absorção da dieta (Rodriguez-peña et al. 2016).

A alta demanda energética exigida durante o voo é abastecida quase que exclusivamente (80%) pela oxidação de açúcares exógenos recém-ingeridos (Welch et al. 2008), diferentemente de outros mamíferos, que utilizam apenas um 30% de combustíveis exógenos durante o exercício e dependem fortemente da oxidação de reservas endógenas (glicogênio e triglicérides) (Garrido et al. 1996; Jentjens et al. 2004). No caso dos morcegos nectarívoros, as reservas de glicogênio parecem ser insuficientes para satisfazer as altas taxas metabólicas geradas durante o voo (Suarez e Welch, 2017). As baixas reservas lipídicas (~6% da sua massa corporal) (Mcnab, 1968; Kelm e Von Helversen, 2007) apresentadas por estas espécies também restringem o uso desta reserva (Voigt e Speakman 2016; Welch et al. 2008).

Em mamíferos, as concentrações de glicose plasmática são mantidas dentro de limites bastante estreitos (4 - 5 mmol/L), independentemente da ingestão de alimentos e do uso de energia durante a atividade física (Polakof et al. 2011; Umminger, 1975). Este controle glicêmico é mantido principalmente pela secreção de insulina pelas células β pancreáticas, a qual permite a utilização da glicose plasmática pelos tecidos periféricos, após sua entrada nas células (Röder et al. 2016). Porém, estudos recentes em ratos demonstram que o consumo de dietas ricas em carboidratos pode gerar aumento da massa de ilhotas pancreáticas, disfunção das células β , hiperglicemia crônica e resistência à insulina (Bonner-weir et al. 1989; Garg et al. 1992; Wachtman et al., 2012). Este processo, também chamado de glicotoxicidade, traz consigo múltiplos distúrbios subsequentes, incluindo nefro, neuro e retinopatias, e em última instância, a redução da expectativa de vida (Kawahito et al. 2009).

Morcegos nectarívoros, no entanto, podem atingir concentrações glicêmicas até três vezes mais elevadas do que o observado em outros mamíferos (Keegan, 1977; Kelm et al., 2011). Mesmo assim, a alta glicemia diminui com o tempo de voo em morcegos ativos (Kelm et al., 2011; Peng et al., 2017). Tem sido sugerido que o exercício é o principal mecanismo pelo qual estas espécies conseguem regular altos níveis de glicose plasmática, resultado de sua dieta hiperglicídica (Kelm et al., 2011). O mecanismo parece ser baseado no fato de que a contração muscular permite uma maior absorção da glicose no músculo esquelético, quando induz a translocação dos receptores de glicose tipo 4 (GLUT4) à membrana sarcolemal, similarmente à ação da insulina (Rose e Richter, 2005; Wasserman et al. 2011). No entanto, ainda não foi investigado se os morcegos nectarívoros dependem exclusivamente deste mecanismo ou se também contam com variações nos níveis de insulina plasmática para realizar o controle glicêmico (Kelm et al., 2011). Também, ainda não está claro como os morcegos nectarívoros escapam dos efeitos negativos da hiperglicemia inerente à sua dieta (Kelm et al., 2011). O excesso de glicose interage com proteínas para formar os produtos finais de glicação avançada (AGEs), que levam a um desequilíbrio das espécies reativas de oxigênio (EROS) (Brunner et al. 2008; Rolo e Palmeira, 2006). As EROS, tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e superóxido (O_2^-), podem ter sua produção incrementada, levando a um eventual dano celular e tecidual

(Blake e Trounce, 2014; King e Loeken, 2004).

Assim, o objetivo deste estudo foi investigar as adaptações morfofisiológicas envolvidas na regulação da glicose plasmática do morcego nectarívoro *Anoura caudifer* (E. Geoffroy, 1818), avaliando as concentrações plasmáticas de glicose e insulina, as concentrações de glicogênio muscular e hepático, os aspectos morfológicos, morfométricos e esteiológicos das ilhotas pancreáticas e a atividade das enzimas antioxidantes e marcadores de estresse oxidativo tecidual de morcegos em repouso e após o exercício.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Captura de animais

Machos (N=16) e fêmeas (N=19) (não-grávidas e não-lactantes) adultos da espécie *Anoura caudifer* (Geoffroy, 1818) foram capturados com o uso de redes de neblina durante a estação chuvosa (outubro 2016 a março 2017) em pomares com cultivo de bananas do Campus da Universidade Federal de Viçosa (UFV) –MG, Brasil (coordenadas 20,76240° S e 42,8501367° W), entre as 17:00 e 23:00 h. Os animais foram identificados com o uso de chave taxonômica (Díaz et al. 2016).

Os morcegos foram transferidos individualmente em sacos de contenção para o Laboratório de Ecofisiologia de Quirópteros (LEQ), onde permaneceram por 17 -19 h em grupos de dois indivíduos dentro de caixas vazadas adaptadas à sua posição de repouso (0.6 x 0.5 x 0.5 m). Durante o cativeiro, os morcegos foram mantidos com alimento para beija-flor (AVITRIN®, Coveli, Brasil), água mel, suco de polpa de pêssego e bananas, e água *ad libitum* (modificado de Kelm et al. 2011). Todos os animais permaneceram em jejum durante pelo menos 10 h antes do experimento com acesso livre à água.

A captura, alojamento e procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (Protocolo 883/2017) e registrados no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade –

SISBIO, Brasil (56105-1).

2.2. Procedimentos experimentais

Os procedimentos experimentais foram realizados à noite. Os animais foram randomicamente distribuídos nos seguintes grupos: o grupo Controle (Controle; N=15) recebeu água via oral e permaneceu em sacos de contenção em inatividade. O grupo Repouso (Reposo; N=10) foi alimentado com uma dose oral de glicose 5,4 g/ Kg de peso corporal em 21% de solução (p/p), o qual é equivalente a 2% do gasto energético diário estimado em morcegos nectarívoros (Kelm et al. 2011), e posteriormente, permaneceu em sacos de contenção em inatividade. O grupo Exercício (Exercício; N=10) foi alimentado com a mesma concentração de glicose utilizada no grupo Repouso, e imediatamente foi induzido a voar (um morcego por vez) dentro de uma tenda plástica de 2 x 2 x 2 m. O teste de voo compreendeu um período de 40 minutos em ciclos repetitivos de 10 minutos de voo e 10 minutos de descanso, para completar um total de 20 minutos de exercício. Os animais de todos os grupos foram eutanasiados por deslocamento cervical seguido de decapitação após 45 (T45, N = 5 para cada grupo) e 90 minutos (T90, N = 5 para cada grupo) da dose oral de glicose (ou água no caso do controle).

O sangue de todos os animais foi coletado do corpo, em tubos contendo heparina e imediatamente centrifugado (3 min a 3000 rpm – 5810R Eppendorf). O plasma foi refrigerado a -80°C para determinação da glicose e insulina plasmática.

2.3. Dissecção e disposição dos tecidos

Após a eutanásia, foi realizada uma laparotomia mediana para remoção do pâncreas (fixado em Boin por 6h, e posteriormente mantido em álcool 70% para análises histológicas), rim e tecido de músculo peitoral (acondicionados em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados a -80 C para análises de estresse oxidativo), fígado e tecido de músculo peitoral (dissolvidos em KOH por um dia para determinação de glicogênio).

2.4. Determinação da insulina em plasma

A insulina plasmática foi determinada em 25 μL de amostra, usando o kit de Insulina por ensaio de imunoabsorção enzimática (Insulin ELISA Kit, IBL International®) a 450 nm. A sensibilidade analítica do método foi de 5 $\mu\text{IU/mL}$.

2.5. Determinação da glicose em plasma

A glicose plasmática foi determinada em 10 μL de plasma sanguíneo, pelo método enzimático glicose-oxidase (Glicose monorreagente K082- BIOCLIN®) segundo especificações do produto, em espectrofotômetro a 515 nm.

2.6. Determinação do glicogênio hepático e muscular

O glicogênio do fígado e músculo peitoral foi medido pelo método descrito por Sjögren et al. (1938) usando glicose como solução padrão. Resumidamente, amostras de tecido (~200 mg) foram dissolvidas em 2 mL de KOH 30%, e colocadas em banho Maria a 90°C por 60 min. O glicogênio foi precipitado em centrífuga duas vezes com etanol absoluto e dissolvido em água destilada. Logo após, adicionou-se 4 mL de reagente de antrona a 2 mL de solução de cada amostra de glicogênio. Os tubos em branco, padrão e reagente foram realizados juntamente com as amostras. O padrão foi preparado dissolvendo 10 mg de glicose em 10 ml de água destilada. A amostra foi fervida durante 10 min e a absorbância foi tomada a 620 nm.

2.7. Análises de estresse oxidativo

2.7.1. Preparação das amostras

Um fragmento de tecido de músculo peitoral e rim (100 mg) foi homogeneizado separadamente em 1 mL de tampão fosfato (pH 7,4; 0,2M com EDTA) e centrifugado a 12000 rpm a 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e Glutathione S-

transferase (GST), da produção de óxido nítrico (NO) e do produto final da lipoperoxidação, malonaldeído (MDA).

2.7.2. **Catalase (CAT)**

A atividade enzimática da CAT foi determinada pela taxa de queda do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (10 mmol/L) em espectrofotômetro a 240 nm durante 60s (Aebi et al., 1984). A atividade da CAT foi expressa como U/mg proteína.

2.7.3. **Superóxido Dismutase (SOD)**

A atividade da enzima SOD foi determinada em leitor de Elisa em 570 nm (Dieterich et al. 2000 modificado) baseado na capacidade desta enzima em catalisar a reação do superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e assim, diminuir a razão de auto-oxidação do pirogalol. A atividade da SOD foi expressa como U/mg de proteína.

2.7.4. **Glutathione S-transferase (GST)**

A enzima glutathione S-transferase (GST) foi mensurada através da formação do conjugado glutathione-2,4-dinitrobenzeno e estimada pela variação da absorvância em 340 nm por 60s. A formação do conjugado ocorreu espontaneamente no substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) em reação não enzimática, sendo acelerada pela atividade da enzima GST. Uma unidade de GST equivale à quantidade de enzima que forma um mol de conjugado glutathione-2,4-dinitrobenzeno por minuto. O coeficiente de extinção molar do CDNB 340 = $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ foi utilizado para os cálculos. A atividade da GST foi expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$.

2.7.5. **Óxido Nítrico (NO)**

O óxido nítrico (NO) foi determinado pelo método de Griess que utiliza sulfanilamida e dicloridratos de N-1-naftil-etilenodiamina em condições ácidas (ácido

fosfórico) (Griess 1879). A concentração do NO foi determinada em leitor de ELISA em 570 nm. Os resultados foram expressos em μM .

2.7.6. Determinação de produtos finais da lipoperoxidação

As substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) são, em sua maioria, produtos da peroxidação lipídica, sendo o Malondialdeído (MDA) um importante marcador para monitorar a taxa de lipoperoxidação. A dosagem de MDA foi realizada de acordo com o método descrito por Buege e Aust (1978). Para a determinação da peroxidação lipídica os tecidos foram homogeneizados em tampão fosfato, e o homogenato foi centrifugado a 3000 g a 4°C por 10 min, adicionado TCA 15%, ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,375% e ácido clorídrico (HCl) 0,25N, e mantido em Banho-Maria por 40 minutos a 90°C, resfriado por 5 minutos no gelo, centrifugado novamente a 3000 rpm por 10 min a 15°C e mensurado em espectrofotômetro a 540 nm. Os resultados foram expressos em $\mu\text{M}/\text{mg}$ proteína.

2.7.7. Quantificação de proteínas

Os resultados de SOD, CAT, e MDA foram normatizados pela quantidade de proteína total. A quantificação de proteínas totais foi determinada pelo método Lowry *et al.* (1951), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão.

2.8. Processamento histológico do pâncreas

Para análise morfológica e estereológica das ilhotas pancreáticas, oito pâncreas de *A. caudifer* foram utilizados. Cada pâncreas foi pesado e imediatamente fixado em solução de Bouin por 6 h e posteriormente preservado em etanol 70%. Os pâncreas foram desidratados em gradiente alcoólico, diafanizados em xilol e emblocados em parafina individualmente. Para cada bloco foram obtidas secções histológicas de 5 μm de espessura utilizando micrótomo rotativo manual (OLYMPUS, CUT 4055), soltando 40 cortes entre as secções selecionadas. As laminas foram coradas com hematoxilina-eosina

de Harris (HE).

2.8.1. **Morfometria das ilhotas pancreáticas**

As análises morfométricas foram realizadas a partir de fotomicrografias das secções histológicas coradas em HE, obtidas por meio de um microscópio acoplado a uma câmera (Leica MC170) projetada em uma tela de computador, em aumento de 200X. Para cada ilhota pancreática foram determinados o diâmetro, a área e o perímetro, utilizando o software Image-Pro Plus (version 7.0 Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Pelo menos 50 ilhotas foram medidas por animal.

2.8.2. **Estereologia do pâncreas**

2.8.2.1. *Volume total do pâncreas*

O volume total do pâncreas foi estimado usando o método de Cavalieri (Gundersen et al., 1988; Mandarin-De-La-Cerda, 2003). Em uma série consecutiva de cortes de 5 μ m de espessura, uma primeira secção histológica a ser avaliada foi selecionada aleatoriamente entre o 1º e o 10º corte, e as seguintes a cada 40 cortes até que todo o órgão fosse cortado. Assim, cada secção avaliada foi representativa de 200 μ m de espessura do tecido.

De cada secção avaliada foram obtidas fotomicrografias em aumento de 40X de modo a cobrir a extensão total do pâncreas, usando um microscópio acoplado a uma câmera de vídeo digital (LEICA DM 750). As imagens foram transferidas para o programa de análises estereológicas STEPanizer BETA 2 (subversion 0.28), que permitiu a sobreposição de um sistema teste de 32 pontos sobre a imagem. Cada ponto foi associado a uma área ponto (38.407,87 μ m²) do sistema teste (Mandarin-De-La-Cerda, 2003). O cálculo do volume total do pâncreas foi então estimado com base no princípio de Cavalieri de acordo com a seguinte equação:

$$V_{(\text{pan})} = t \times a(p) \times \sum P_{\text{pan}}$$

Onde $V_{(\text{pan})}$ é o volume total de pâncreas, t é a espessura de tecido representada por cada corte (no caso 200 μm), $a(p)$ é a área associada a cada ponto (38.407,87 μm^2) e $\sum P_{\text{pan}}$ é a somatória de pontos incidente no pâncreas. O volume foi expresso em mm^3

2.8.2.2. Número total de ilhotas ($N[\text{ilhota}]$)

O número total de ilhotas pancreáticas foi estimado usando o método do dissector (Bock et al. 2005). A cada 200 μm foram examinados pares de secções histológicas separados entre si por 20 μm . A primeira secção de cada par foi denominada plano de contagem e a segunda, plano de referência. Sobre cada plano foi sobreposto um sistema teste constituído por um quadrado de área fixa conhecida (*frame* 578.307,64 μm^2) e delimitada por quatro linhas. As linhas superior e direita foram denominadas de linhas de inclusão e as linhas inferior e esquerda, linhas de exclusão. Assim, o número de ilhotas (Q^-) foi obtido contando-se as ilhotas que não tocaram as linhas de exclusão e que estiveram presentes no plano de contagem, mas não as que apareceram no plano de referência (Machado-Santos et al., 2013). A densidade numérica das ilhotas ($N_v[\text{ilhota}]$) foi expressa em número de ilhotas por mm^3 . As análises estereológicas foram feitas no programa STEPanizer BETA 2 utilizando-se fotomicrografias com aumento de 100X. A densidade numérica das ilhotas ($N_v[\text{ilhota}]$) foi estimada como:

$$N_v[\text{ilhota}] = Q^- / (A_T \times h)$$

Onde, Q^- é o número de ilhotas, A_T é a área do sistema teste (*frame*, 578.307,64 μm^2), h é a distância entre os cortes adjacentes (20 μm).

O número total das ilhotas ($N[\text{islet}]$) foi finalmente estimado como o produto do volume calculado do pâncreas ($V[p]$) pela densidade numérica das ilhotas ($N_v[\text{ilhota}]$):

$$N[\text{ilhota}] = V[p] \times N_v[\text{ilhota}]$$

2.8.2.3 Densidade volumétrica da ilhota (V_v [ilhota])

Para o cálculo da densidade volumétrica da ilhota foi utilizado um sistema teste de 64 pontos sobreposto em todas as seções de contagem do pâncreas, contando-se o número de pontos sobre as ilhotas (Machado-Santos et al., 2013). A densidade volumétrica da ilhota (V_v [islet]) foi então estimada dividindo-se o número de pontos sobre ilhotas (P_p) pelo número total de pontos do sistema teste (PT):

$$V_v \text{ [islet]} = P_p \text{ [islet]} / PT (\%).$$

2.9. Análise estatística

Os resultados foram expressos em média \pm EPM (erro padrão da média). Foi empregada a ANOVA não paramétrica Kruskal-Wallis e o teste pos-hoc Mann-Whitney. O nível de significância utilizado foi de 5%. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o programa Graphpad Prism (version 6.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

3. RESULTADOS

3.1. Glicemia

A concentração de glicose plasmática mensurada no T45 em morcegos em repouso ($14,45 \pm 2,46$ mmol/L) foi maior que a observada em morcegos em exercício no mesmo tempo ($5,06 \pm 1,28$ mmol/L) ($U = 1,0$; $p = 0,008$) (Figura 1). Os valores glicêmicos em T90 foram semelhantes entre os grupos Repouso e Exercício ($U = 11$; $p = 0,75$) (Figura 1).

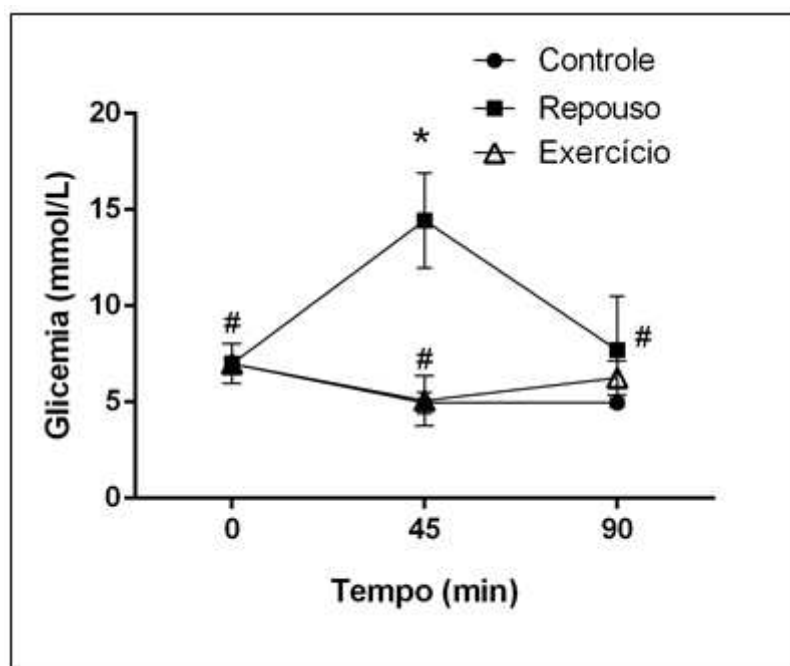


Figura 1 Concentração de glicose plasmática (média \pm EPM) em morcegos *Anoura caudifer* em repouso e submetidos ao exercício de voo após zero, 45 e 90 minutos da dose oral de glicose (5,4 g de D-glicose/K de peso corporal, em 21% solução p/p). (*) Diferença significativa ($P < 0,05$) do grupo Repouso em relação aos grupos Controle e Exercício no T45. Teste Mann-Whitney, ao nível de significância de 5%.

3.2. Insulina plasmática

Não houve variação significativa nas concentrações de insulina plasmática após a dose oral de glicose nos grupos Repouso e Exercício ($X^2 = 6,88$; $p = 0,33$) nos tempos avaliados (Figura 2).

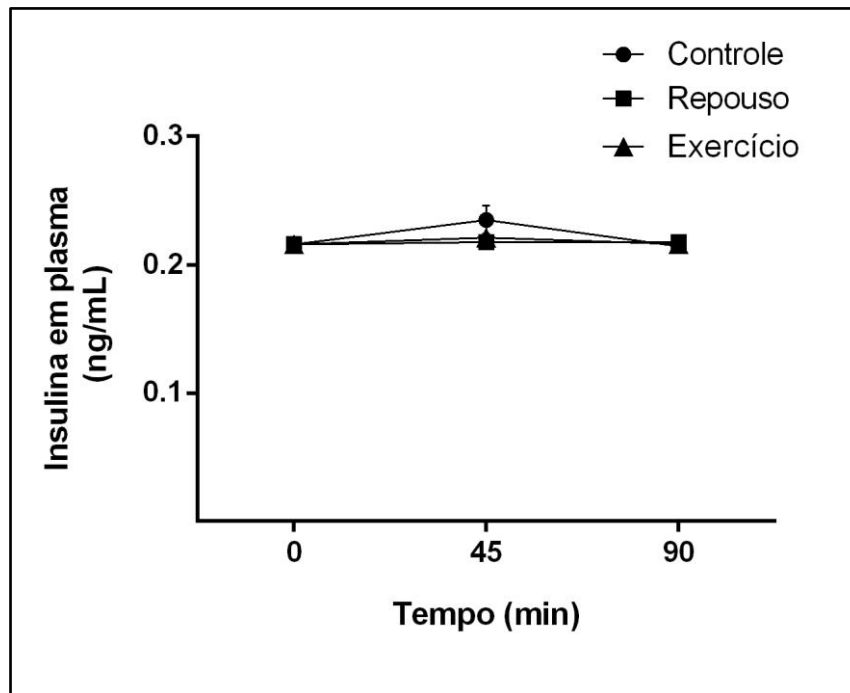


Figura 2. Concentração plasmática de insulina (média \pm EPM) em morcegos *Anoura caudifer* em repouso e em exercício de voo após 0, 45 e 90 minutos da dose oral de glicose (5,4 g de D-glicose/K de peso corporal, em 21% solução p/p). Teste Kruskal-Wallis ao nível de significância de 5%.

3.3. Glicogênio hepático e muscular

A concentração de glicogênio hepático do grupo controle no T0 foi $15,18 \pm 0,88 \mu\text{mol}$ glucosil-unidades/g. Não houve diferença significativa na concentração de glicogênio hepático em animais do grupo Repouso em relação ao grupo Exercício nos diferentes tempos avaliados ($X^2 = 1,265$ $p = 0,974$) (Figura 3A).

A concentração de glicogênio no músculo peitoral do grupo Controle no T0 foi $0,62 \pm 0,12 \mu\text{mol}$ glucosil-unidades/g. Não houve diferença significativa na concentração de glicogênio do músculo peitoral em animais do grupo Repouso quando comparado ao grupo Exercício nos diferentes tempos avaliados ($X^2 = 4,47$ $p = 0,613$) (Figura 3B).

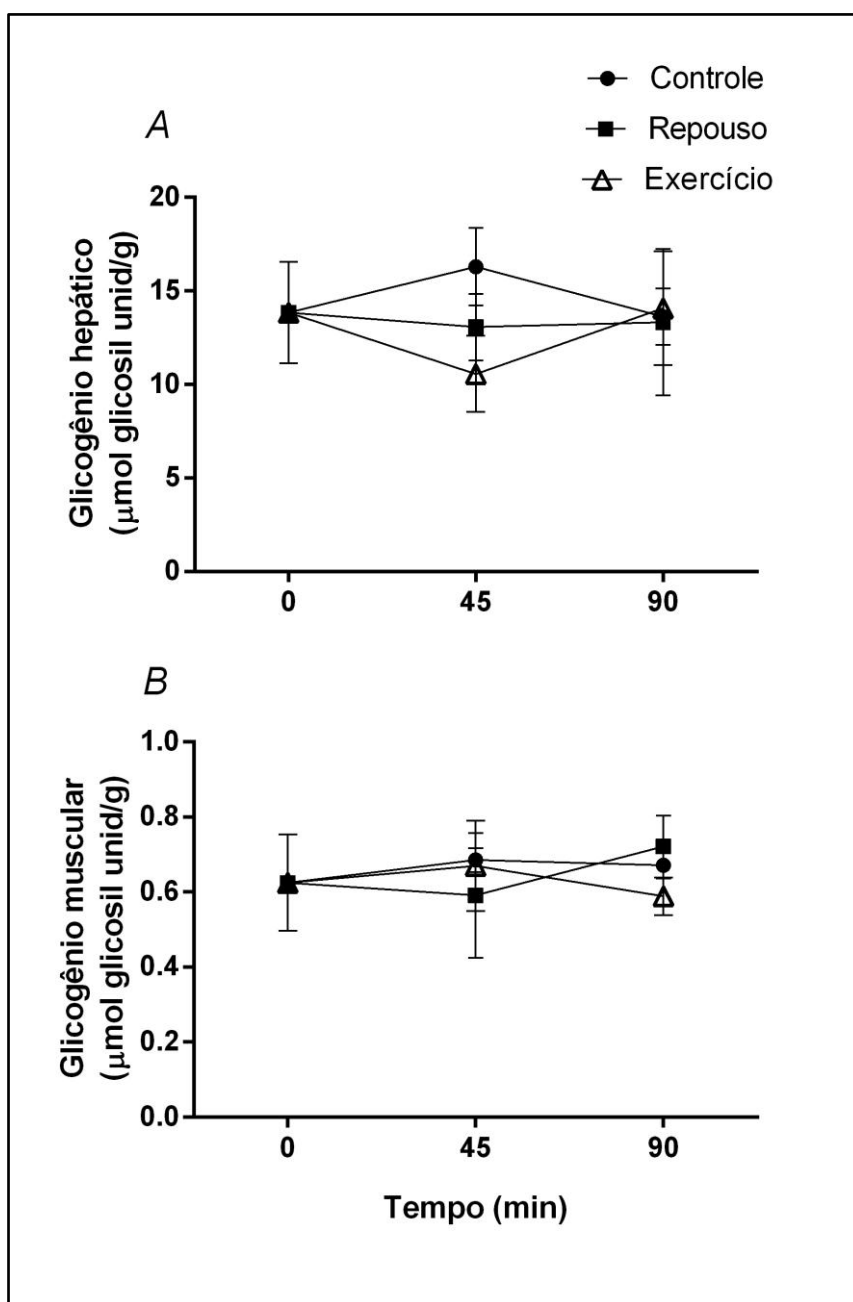


Figura 3. Concentrações de glicogênio hepático (A) e muscular (B) (média \pm EPM) em morcegos *Anoura caudifer* em repouso e exercício de voo, determinadas após 0, 45 e 90 minutos da dose oral de glicose (5.4 g de D-glicose/K de peso corporal, em 21% solução p/p) Teste Kruskal-Wallis ao nível de significância de 5%.

3.4. Estresse oxidativo

Para o músculo peitoral não foi encontrada diferença significativa na atividade das enzimas antioxidantes e marcadores do estresse oxidativo em resposta ao exercício nos diferentes tempos avaliados ($p > 0,05$) (Figura 4 A-D). A concentração para óxido nítrico (NO) no músculo peitoral não foi revelada por ficar abaixo do nível mínimo de detecção ($< 0,1 \mu\text{M L}^{-1}$).

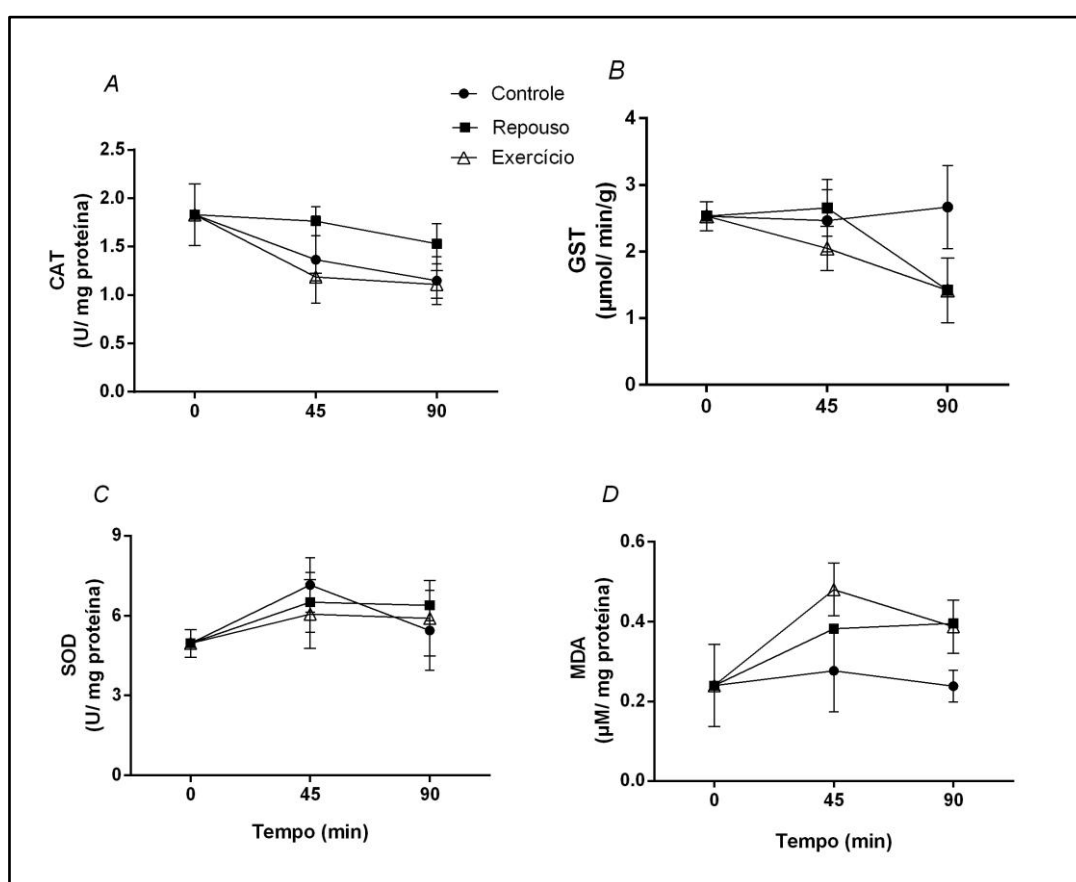


Figura 4. Atividade das enzimas antioxidantes (média \pm EPM): A. catalase (CAT), B. glutathione S-transferase (GST) e C. superóxido dismutase (SOD); e D. concentração do produto de lipoperoxidação, Malonaldeído (MDA), em músculo peitoral de morcegos *Anoura caudifer* em repouso e exercício de voo, determinadas após 0, 45 e 90 minutos de dose oral de glicose (5.4 g de D-glicose/K de peso corporal, em 21% solução p/p).. Valores da concentração de óxido nítrico (NO) não são reportados por estarem abaixo do nível limite de detecção ($< 0,1 \mu\text{M L}^{-1}$). Teste Kruskal-Wallis ao nível de significância de 5%.

Com relação ao rim, o grupo Exercício no T90 apresentou um incremento significativo na concentração do NO em relação ao grupo Repouso ($U = 1$; $p = 0,043$) e em relação aos diferentes tempos dentro do grupo Exercício ($U = 1$; $p = 0,014$). (Figura 5A). A atividade da CAT no grupo Exercício apresentou um aumento significativo no T90 quando comparado ao T45 ($U = 2$; $p = 0,018$) no mesmo grupo; não houve diferença significativa no grupo Exercício T90 com respeito ao grupo Repouso ($U = 6$; $p = 0,175$) (Figura 5 B). Não foram observadas diferenças significativas na atividade das enzimas antioxidantes GST, SOD e os produtos da peroxidação lipídica (MDA) avaliadas no rim no grupo Repouso com respeito ao grupo Exercício ($p > 0,05$) (Figura 6 C - E).

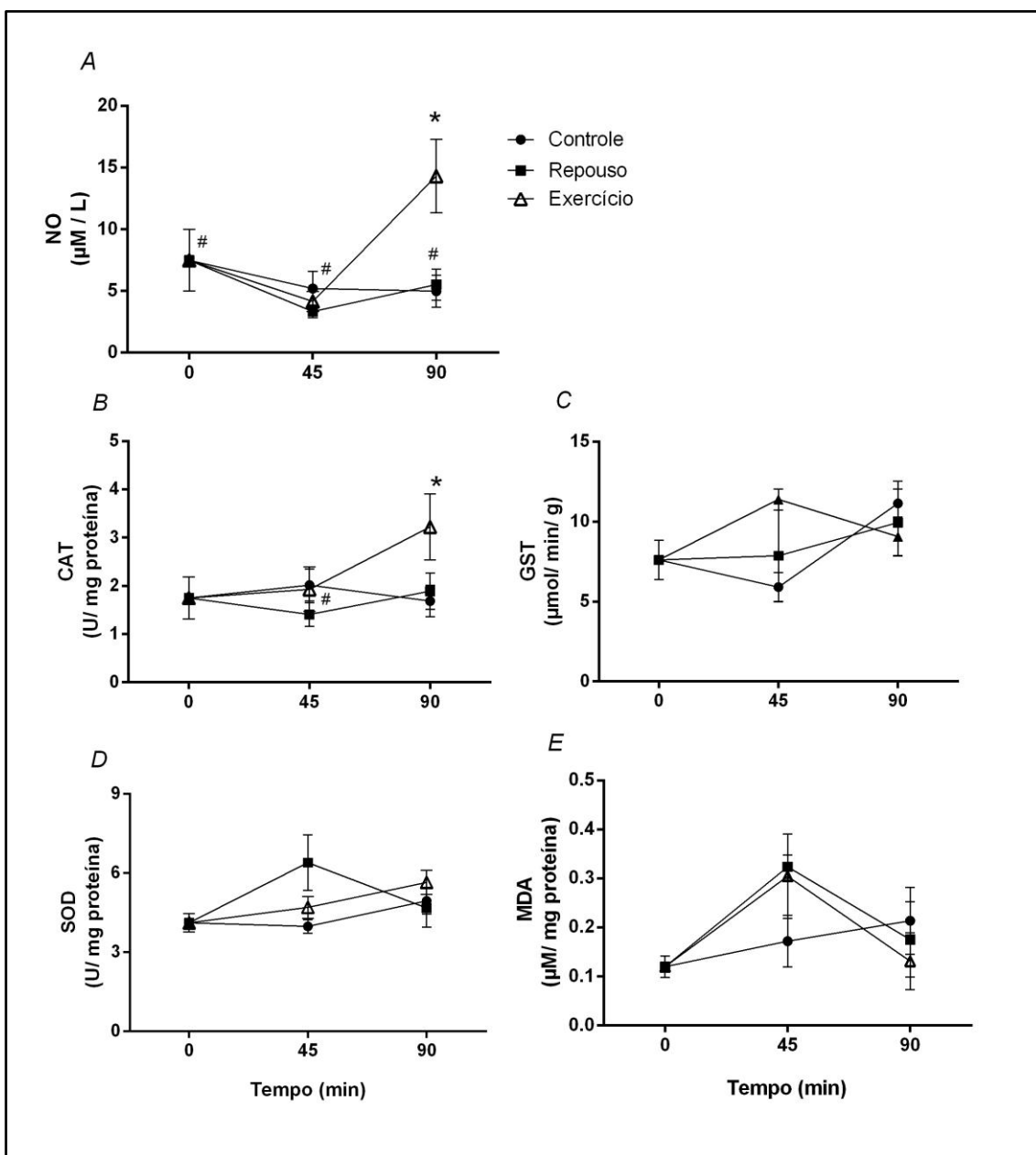


Figura 5. Atividade das enzimas antioxidantes (média \pm EPM): A. óxido nítrico B. catalase (CAT), C. glutationa S-transferase (GST) e D. superóxido dismutase (SOD); e E. concentração do produto de lipoperoxidação, Malonaldeído (MDA), em rins de morcegos *Anoura caudifer* em repouso e exercício de voo, determinadas após 0, 45 e 90 minutos da dose oral de glicose (5.4 g de D-glicose/K de peso corporal, em 21% solução p/p). * Diferença significativa ($P < 0,05$) do grupo Exercício em relação aos grupos Controle e Repouso no tempo 90, e entre os diferentes tempos dentro do grupo Exercício. Teste Mann-Whitney, ao nível de significância de 5%.

3.5. Morfometria e estereologia do pâncreas

3.5.1. Morfologia geral

O pâncreas de *A. caudifer* está situado ventralmente na cavidade abdominal perto do duodeno e se estende transversalmente até o estômago. A média da massa pancreática foi de $0,023 \pm 0,0078$ g e a média do peso corporal foi de $9,7 \pm 0,73$ g.

O pâncreas de *A. caudifer* está organizado em lóbulos visivelmente diferenciados (Figura 6A). A porção exócrina foi facilmente diferenciada da porção endócrina após coloração com Hematoxilina e Eosina (HE). A parte exócrina do pâncreas é composta de células acinares e um sistema de dutos intralobulares, os quais convergem para formar dutos interlobulares (Figura 6A e B).

Na porção endócrina as ilhotas foram coradas por Eosina apresentando uma forma irregular a circular, e estiveram amplamente distribuídas ao longo do pâncreas (Figura 6C). A figura 6D apresenta uma ilhota típica delimitada por uma linha pontilhada ressaltando sua forma.

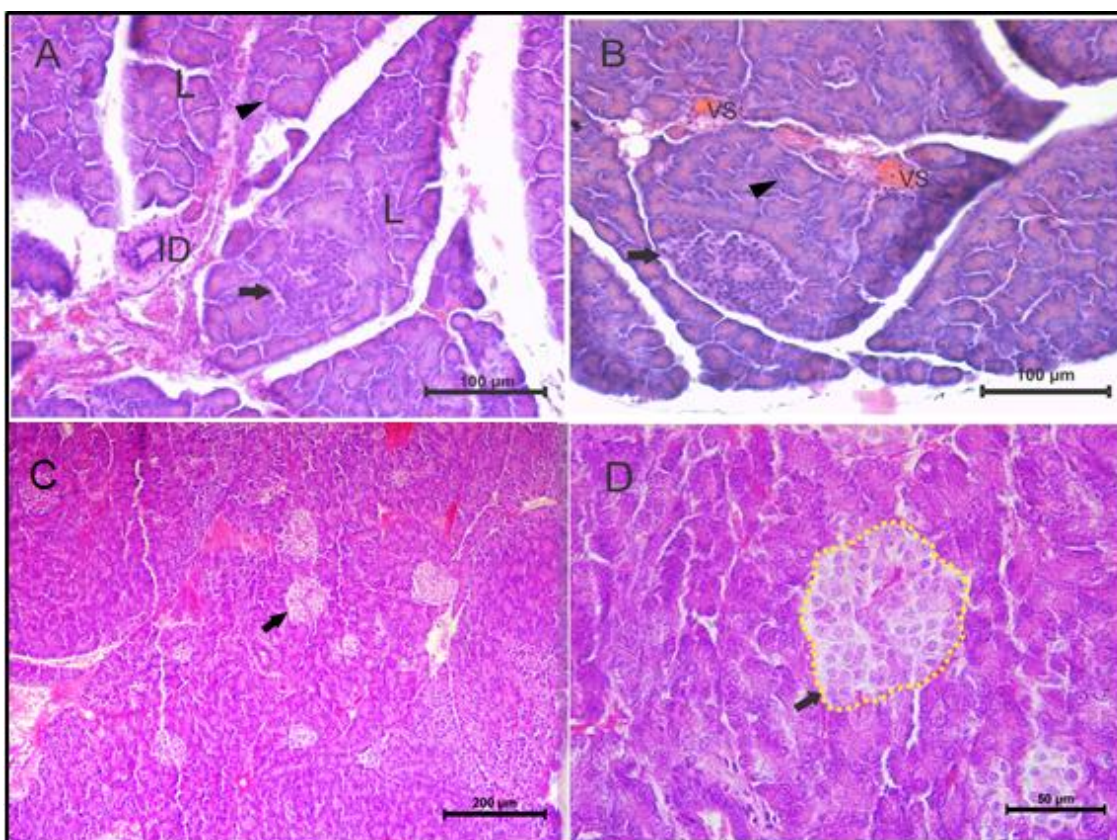


Figura 6. A-D: Fotomicrografias do pâncreas de *Anoura caudifer* mostrando a porção exócrina acinar (cabeças de seta) junto com a porção endócrina, representada pelas ilhotas (setas pretas). ID – interducto, L- lóbulos pancreáticos, VS- vasos sanguíneos. Coloração por HE.

3.5.2. Morfometria

As características morfométricas das ilhotas pancreáticas são resumidas na Tabela 1. As ilhotas pancreáticas apresentaram diâmetro médio de $79,8 \pm 1,43 \mu\text{m}$.

Tabela 1. Parametros morfométricos das ilhotas pancreáticas de morcegos *A. caudifer*.

	Área	Diâmetro	Perímetro	Per-Área	Tamanho - Comprimento	Tamanho - Largura
Média ± EPM	$5374,49 \pm 192,2$	$79,8 \pm 1,43$	$276,745 \pm 5,23$	$0,051 \pm 0,001$	$94,43 \pm 1,95$	$65,17 \pm 1,24$

A área é dada em μm^2 , e as demais medidas em μm .

3.5.3. Estereologia

As características estereológicas do pâncreas são resumidas na Tabela 2. A média do número de ilhotas pancreáticas (N[ilhotas]) foi estimada em 1517 ± 291 ilhotas; a densidade volumétrica das ilhotas (Vv) foi de 13 %.

Tabela 2. Parâmetros estereológicos das ilhotas pancreáticas de morcegos *A. caudifer*.

Volume total do pâncreas (V [pan])	Densidade numerica das ilhotas (Nv [ilhota])	Número total de ilhotas (N [ilhota])	Densidade volumetrica das ilhotas (Vv [ilhota])
$1,03 \pm 0,07$	1517 ± 110	$1562,51 \pm 228,6$	$13,25 \pm 1,2$

O V[pan] é dado em mm^3 , a Nv[ilhota] em numero de ilhotas por mm^3 , N [ilhota] em valor absoluto, Vv [ilhota] em porcentagem (%)

4. DISCUSSÃO

Neste estudo, foi avaliada a importância do exercício e da secreção de insulina na regulação da glicose plasmática no morcego nectarívoro *Anoura caudifer*. Nós encontramos que a ingestão de uma carga de glicose semelhante à ingerida na sua dieta (5,4 T0, T45 e T90) de uma dose oral de glicose (5,4 g / Kg de peso corporal) foi capaz de dobrar os níveis de glicose plasmática observados em morcegos não alimentados. O exercício (20 min) teve um efeito considerável sobre a diminuição da glicose plasmática até valores que são normais em mamíferos (4,4 -5 mmol/L) (Polakof et al. 2011). Os níveis de insulina plasmática foram baixos ($0,22 \pm 0,002$ ng/mL), perto do limite de detecção (5 $\mu\text{U/mL}$), e não mudaram após a ingestão de glicose em animais em repouso e nem sob exercício. Estes resultados respaldam a hipótese de que morcegos nectarívoros não regulam sua glicemia apenas pela secreção de insulina, como ocorre na maioria dos mamíferos (Kelm et al. 2011; Peng et al. 2017).

Este é o primeiro estudo que avalia os níveis plasmáticos de insulina na regulação da glicose em morcegos nectarívoros. A concentração de insulina plasmática em *A. caudifer* foi quase 3,6 vezes menor do que a reportada em morcegos hematófagos (*Desmodus*

rotundus), que apresentam uma dieta pobre em carboidratos (<1%) (Freitas et al. 2013), e 7,5 vezes menor do que morcegos frugívoros (*Artibeus lituratus*) (Protzek et al. 2010). A baixa secreção de insulina em morcegos nectarívoros em repouso parece ser capaz de diminuir lentamente os altos níveis de glicose plasmática após 90 min da ingestão de alimento. Porém, estes animais são incapazes de controlar seus níveis glicêmicos quando são alimentados com quantidades suprafisiológicas de glicose (>5,4 g / Kg de peso corporal) como tem sido reportado em estudos anteriores com morcegos nectarívoros *Glossophaga soricina* (Kelm et al. 2011) e *Eonycteris spelaea* (Peng et al. 2017).

Estudos prévios demonstram a importância do exercício no controle glicêmico e de modo independente da ação da insulina (Boule et al., 2005; Rose & Richter, 2005). Em cachorros, o exercício demonstrou uma diminuição nos níveis plasmáticos de glicose, porém nenhum efeito foi observado sobre a insulinemia (Zinker et al. 1993). Estudos em humanos com diabetes tipo II mostraram que uma única sessão de exercício (45 min) pode diminuir a glicose plasmática (de 7,6 para 4,77 mmol /L), apesar da queda nos níveis de insulina plasmática (Musi et al., 2001). Isto pode ser explicado pelo fato de que a contração muscular pode aumentar a taxa de absorção de glicose pela translocação dos transportadores de glicose tipo 4 (GLUT4), independentemente da insulina (Douen et al., 1989; Rose & Richter, 2005). Morcegos nectarívoros expressam altos níveis de GLUT4 e hexoquinase nos músculos pectorais, maiorea que aos obseados no músculo gastrocnêmio de camundongo, o que leva a maiores taxas do metabolismo da glicose durante o exercício (Douen et al. 1990; Suarez & Welch, 2017).

Morcegos nectarívoros apresentam maiores taxas de absorção intestinal (via paracelular) e de oxidação de carboidratos exógenos pelos músculos, comparadas às de mamíferos de igual tamanho (Rodriguez-peña et al., 2016; Voigt e Speakman, 2016). Estas adaptações à nectarivoria são compartilhadas com os beija-flores, os quais apresentam dietas semelhantes e hiperglicemia após alimentação (~40mmol/L) (Beuchat & Chong, 1998). No entanto, ao contrário dos morcegos, os beija-flores não expressam proteínas GLUT4 (Welch et al. 2013). Assim, se desconhece a eficácia da insulina na regulação da glicose plasmática em beija-flores que são altamente insensíveis a este

hormônio (Braun & Sweazea, 2008). Ainda que, os mecanismos que controlam o metabolismo da glicose em vertebrados nectarívoros estejam apenas sendo elucidados, a evidência sugere que o exercício é necessário para regular os níveis glicêmicos em algum grau de independência à insulina (Welch et al., 2013).

Diversos estudos demonstram que os estoques de glicogênio muscular e hepático encontraram-se depletados em vertebrados após o exercício (Garrido et al., 1996; Musi et al., 2001; Zinker et al., 1993). Este fator deve-se principalmente ao fato de que o glicogênio armazenado no fígado e no músculo torna-se um importante substrato energético com o aumento na intensidade do exercício (Jensen e Richter, 2012; Wasserman et al. 2011). Em *Anoura caudifer*, não foi observado nenhum efeito significativo do exercício sobre as reservas de glicogênio muscular e hepático após 45 e 90 minutos de voo. A mobilização deste substrato energético para o voo em nectarívoros foi estimada em 1/8 da quantidade total de glicogênio hepático (Welch et al., 2008). Nossos resultados confirmam que as reservas endógenas de glicogênio não são significativamente usadas durante o exercício em morcegos nectarívoros. Este fato pode se dar pela sua alta dependência por açúcares exógenos e pelo seu eficiente mecanismo de absorção intestinal (via paracelular), que possibilita altas taxas de oxidação de glicose exógena diretamente pelos músculos (Suarez e Welch 2011).

O tamanho médio das ilhotas de *A. caudifer* (79,8 μm) foi maior que em morcegos hematófagos (*D. rotundus*, 41 μm) e insetívoros (*P. personatus*, 40,4 μm), que apresentam dietas pobres em carboidratos (Freitas et al., 2013; Machado-santos et al., 2017). Além disso, a porcentagem de tecido endócrino, estimada como a densidade volumétrica das ilhotas, foi alta (13,0%) quando comparada com a de morcegos insetívoros (3,4%) (Machado-santos et al., 2017) e hematófagos (4,1%) (Machado-Santos et al., 2013). Michelmores et al. (1998) também encontraram uma alta porcentagem de tecido endócrino (9%) no morcego frugívoro *Rousettus aegyptiacus*.

O consumo de dietas ricas em carboidratos simples aumenta a demanda por insulina, podendo promover, a longo-prazo, a resistência à insulina, e prejudicar a função das

células β das ilhotas pancreáticas. Primatas (e.g. *Callithrix jacchus*) e ratos alimentados com dietas ricas em carboidratos apresentaram elevada hiperplasia das ilhotas pancreáticas, além de incremento na massa das células β , em resposta ao aumento no requerimento de insulina (Bonner-weir et al. 1989; Wachtman et al., 2012). Porém parece que os morcegos nectarívoros, apesar de sua dieta rica em carboidratos, não apresentam estes danos tão marcados como o visto em mamíferos hiperglicêmicos.

Em relação aos possíveis danos oxidativos teciduais envolvidos no metabolismo energético, comum em animais com dietas muito ricas em carboidratos, não foram encontradas alterações na atividade das enzimas antioxidantes após o exercício no músculo peitoral de *A. caudifer*. Nos rins, nós observamos que *A. caudifer* apresentou um aumento significativo na concentração do NO e na atividade da CAT após 90 minutos da dose oral de glicose no grupo exercício. Aumento da SOD e da CAT também foi reportado por Wilhelm et al. (2007) em rins de morcegos filostomídeos. Isto contrasta com estudos de ratos hiperglicêmicos que tiveram os níveis de NO e da atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT diminuídos como consequência do incremento do estresse oxidativo (Derubertis et al. 2004; Prabhakar et al. 2007). Considerando que o NO é um importante vasodilatador e controlador do nível basal da resistência vascular renal (Guimarães et al. 2008), o exercício parece prevenir que *A. Caudifer* desenvolva falência renal produzida pela hiperglicemia.

5. CONCLUSÃO

Em conclusão, os morcegos nectarívoros da espécie *A. caudifer* são pouco eficientes em regular as concentrações de glicose plasmática pela ação da insulina, diferentemente do observado na maioria dos mamíferos. Ao contrário do esperado para um mamífero de dieta rica em carboidratos, estes animais parecem precisar do exercício de alta intensidade, representado pelo voo, para manter sua normoglicemia. Este fato é evidenciado pelo atraso para restabelecer a normoglicemia após o consumo de glicose em repouso, por ação da insulina. Porém, não podemos determinar, a partir deste estudo, se a regulação da glicemia pelo efeito do exercício é causada exclusivamente por

mecanismos independentes da secreção de insulina. Os morcegos nectarívoros dependem pouco de reservas endógenas de glicogênio no fígado e músculo para sustentar seu gasto energético durante o voo dada sua alta dependência de carboidratos exógenos. As características das ilhotas pancreáticas mantêm parâmetros morfológicos normais e não apresentam alterações evidentes como observado em animais com dietas ricas em carboidratos. O exercício não influencia a expressão das enzimas antioxidantes a curto prazo no músculo peitoral; mas tem um efeito importante sobre a produção do NO e catalase nos rins, o que indica um papel importante desta enzima na proteção contra o estresse oxidativo tecidual. Este estudo avança o conhecimento das adaptações morfofisiológicas desenvolvidas por morcegos nectarívoros para regular os níveis de glicose plasmáticos.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi, H. (1984) Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* 105, 121-126.
- Ayala-Berdon, J., Rodríguez-Peña, N., Orduña-Villaseñor, M., Stoner, K. E., Kelm, D. H., & Schondube, J. E. (2011). Foraging behavior adjustments related to changes in nectar sugar concentration in phyllostomid bats. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 160(2), 143–148.
- Baker, H. G., Baker, I., & Hodges, S. A. (2016). Sugar Composition of Nectars and Fruits Consumed by Birds and Bats in the Tropics and Subtropics. *Biotropica*, 30(4), 559–586.
- Beuchat, C. A., & Chong, C. R. (1998). Hyperglycemia in hummingbirds and its consequences for hemoglobin glycation. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 120, 409–416.
- Blake, R., & Trounce, I. A. (2014). Mitochondrial dysfunction and complications associated with diabetes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840(4), 1404–1412.
- Bock, T., Kyhnel, A., Pakkenberg, B., & Buschard, K. (2003). The postnatal growth of the β -cell mass in pigs. *Journal of Endocrinology*, 179, 245–252.
- Bock, T., Pakkenberg, B., & Buschard, K. (2005). Genetic Background Determines the Size and Structure of the Endocrine Pancreas. *Diabetes*, 54, 133–137.

- Bonner-weir, S., Deery, D., Leahy, J. L., & Weir, G. C. (1989). Compensatory Growth of Pancreatic beta-Cells in Adult Rats After Short-Term Glucose Infusion. *Diabetes*, 38, 49–53.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid, Peroxidation. In: Flesicher, S., Packer, L. (Eds.), *Methods in Enzymology*. Vol. 52. Academic Press, New-York, pp. 302–310
- Boule, N.G., Weisnagel, S.J., Lakka, T.A., Tremblay, A., Bergman, R.N., Rankinen, T., Leon, A.S., Skinner, J.S., Wilmore, J.H., Rao, D.C., Bouchard, C. (2005). Effects of Exercise Training on Glucose Homeostasis. *Diabetes Care*, 28(1), 108–114.
- Braun, E. J., & Sweazea, K. L. (2008). Glucose regulation in birds. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 151, 1–9.
- Brunner, Y., Schwartz, D., Priego-capote, F., Couté, Y., & Sanchez, J. (2008). Glucotoxicity and pancreatic proteomics. *Journal of Proteomics*, 71(6), 576–591.
- Derubertis, F. R., Craven, P. A., Melhem, M. F., & Salah, E. M. (2004). Attenuation of Renal Injury in db/db Mice Overexpressing Superoxide Dismutase. *Diabetes*, 53, 16–18.
- Díaz, M. ., Solari, S., Aguirre, L. F., Aguiar, L. M. S., & Barquez, R. M. (2016). Clave de identificación de los murciélagos de Sudamérica. *Programa de Conservación de Los Murciélagos de Argentina*, (2), 1–160.
- Dieterich, S., Bieligg, U., Beulich, K., Hasenfuss, G., & Prestle, J. (2000). Gene Expression of Antioxidative Enzymes in the Human Heart. *Circulation*, 101(1), 33–39.
- Douen, A. G., Ramlal, T., Cartee, G. D., & Klip, A. (1990). Exercise modulates the insulin-induced translocation of glucose transporters in rat skeletal muscle. *Federation of European Biochemical Societies*, 261(2), 256–260.
- Douen, A. G., Ramlal, T., Klip, A., Young, D. A., Cartee, G. D., & Holloszy, J. (1989). Exercise-Induced Increase in Glucose Transporters in Plasma Membranes of Rat Skeletal Muscle. *Endocrinology*, 124(1), 449 – 454.
- Freitas, M. B., Queiroz, J. F., Dias Gomes, C. I., Collares-Buzato, C. B., Barbosa, H. C., Boschero, A. C., Gonçalves, C.A., Pinheiro, E.C., Pinheiro, E.C. (2013). Reduced insulin secretion and glucose intolerance are involved in the fasting susceptibility of common vampire bats. *General and Comparative Endocrinology*, 183, 1–6
- Garg, A., Grundy, S. M., & Koffler, M. (1992). Effect of High Carbohydrate Intake on Hyperglycemia, Islet Function, and Plasma Lipoproteins in NIDDM. *Diabetes Care*, 15(11), 1572–1580.

- Garrido, G., Guzman, M., & Odiozola, J. M. (1996). Effects of physical training on fatty acid metabolism in liver and skeletal muscle of rats fed four different high-carbohydrate diets. *Nutritional Biochemistry*, 2863(96), 348–355.
- Griess, P. (1879) Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. Weselsky und Benedikt Ueber einige azoverbindungen. *Chem. Ber.* 12, 426–8.
- Guimarães, V., Cruvelo, D. F., Borges, N., & Júnior, D. S. (2008). Avaliação da produção de óxido nítrico em ratos, submetidos aos exercícios aeróbio e anaeróbio. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 44, 755–761.
- Gundersen, G., Bendtsen, T.F., Korbo, L., Marcussen, N., Moller, A., Nielsen, K., Nyengaard, R., Pakkenberg, B., Sorensen, F B., Vesterby, A. & West, M J. (1988). Some new , simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*, (96), 379–394.
- Helversen, O. v., & Reyer, H.-U. (1984). Nectar intake and energy expenditure in a flower visiting bat. *Oecologia*, (63), 178–184.
- Hernandez, A., & Martinez Del Rio, C. (1992). Intestinal Disaccharidases in Five Species Of Phyllostomoid Bats. *Com. Biochem. Physiol.*, 103(1), 105–111.
- Jensen, T. E., & Richter, E. A. (2012). Regulation of glucose and glycogen metabolism during and after exercise. *Journal Physiology*, 5, 1069–1076.
- Jentjens, R. L. P. G., Venables, M. C., & Jeukendrup, A. E. (2004). Oxidation of exogenous glucose, sucrose, and maltose during prolonged cycling exercise. *Journal of Applied Physiology*, 96(4), 1285–91.
- Kawahito, S., Kitahata, H., & Oshita, S. (2009). Problems associated with glucose toxicity: Role of hyperglycemia-induced oxidative stress. *World Journal of Gastroenterology*, 15(33), 4137–4142.
- Keegan, D. J. (1977). Aspects of the Assimilation of Sugars by *Rousettus Aegyptiacus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 58A(1925), 349– 352.
- Kelm, D. H., Simon, R., Kuhlow, D., Voigt, C. C., & Ristow, M. (2011). High activity enables life on a high-sugar diet: blood glucose regulation in nectar-feeding bats. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278(1724), 3490–3496.
- Kelm, D. H., & Von Helversen, O. (2007). How to budget metabolic energy: Torpor in a small Neotropical mammal. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 177(6), 667–677.
- King, G. L., & Loeken, M. R. (2004). Hyperglycemia-induced oxidative stress in diabetic complications. *Histochem Cell Biol*, 122, 333–338.

- Kjeld, M., & Ólafsson, O. (2008). Allometry (scaling) of blood components in mammals: connection with economy of energy? *Can. J. Zool.*, *86*, 890–899.
- Lowry, O.H., Rosbrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* *193*:265-75
- Machado-santos, C., Cesar, J., Aquino, F., Adriano, P., Abidu-figueiredo, M., Brito-gitirana, L. De, & Sales, A. (2017). Tissue and Cell Influence of feeding habits in the endocrine pancreas of insectivore bat *Pteronotus personatus* and nectarivore bat *Anoura geoffroyi*: A comparative stereological and immunohistochemical study. *Tissue and Cell*, *49*, 1–7.
- Machado-Santos, C., Fraulo, J. C. A., Simanas, J. M., Abidu-Figueiredo, M., Marcos Mendes, R. M., & Sales, A. (2013). What difference exists in the pancreas of mammals with sanguivorous diet? A morphological , stereological and immunohistochemical study of the pancreatic islets of the hematophagous bat *Diphylla ecaudata*. *Regulatory Peptides*, *183*, 62–68.
- Mandarim-De-La-Cerda, C. A. (2003). Stereological tools in biomedical research. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, *75*(4), 469–486.
- McNab, B. K. (1968). The Influence Of Fat Deposits On The Basal Rate Of Metabolism In Desert Homoiotherms. *Comp. Biochem. Physiol.*, *26*, 337–343.
- Michelmores, a J., Keegan, D. J., & Kramer, B. (1998). Immunocytochemical identification of endocrine cells in the pancreas of the fruit bat, *Rousettus aegyptiacus*. *General and Comparative Endocrinology*, *110*(3), 319–325.
- Musi, N., Fujii, N., Hirshman, M. F., Ekberg, I., Fro, S., Ljungqvist, O., Thorell, A., Goodyear, L. J. (2001). AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) Is Activated in Muscle of Subjects With Type 2 Diabetes During Exercise. *Diabetes*, *50*, 921–927.
- Peng, X., He, X., Liu, Q., Sun, Y., Liu, H., Zhang, Q., Liang, J., Peng, Z., Liu, Z., Zhang, L. (2017). Flight is the key to postprandial blood glucose balance in the fruit bats *Eonycteris spelaea* and *Cynopterus sphinx*. *Ecology and Evolution*, *7*:8804–8811.
- Polakof, S., Mommsen, T. P., & Soengas, J. L. (2011). Glucosensing and glucose homeostasis: From fish to mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, *160*(4), 123–149.
- Prabhakar, S., Starnes, J., Shi, S., Lonis, B., & Tran, R. (2007). Diabetic Nephropathy Is Associated with Oxidative Stress and Decreased Renal Nitric Oxide Production. *J Am Soc Nephrol*, *18*, 2945–2952.
- Protzek, A. O. P., Rafacho, A., Viscelli, B. A., Bosqueiro, J. R., Cappelli, A. P., Paula, F. M. M., Boschero, A.C., & Pinheiro, E. C. (2010). Insulin and glucose sensitivity, insulin secretion and b-cell distribution in endocrine pancreas of the fruit bat

- Artibeus lituratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 157(2), 142–148.
- Röder, P. V., Wu, B., Liu, Y., & Han, W. (2016). Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Experimental and Molecular Medicine*, 48, 1–19.
- Rodriguez-peña, N., Price, E. R., Caviedes-vidal, E., Flores-ortiz, C. M., & Karasov, W. H. (2016). Intestinal paracellular absorption is necessary to support the sugar oxidation cascade in nectarivorous bats. *Journal of Experimental Biology*, 219, 779–782.
- Rolo, A. P., & Palmeira, C. M. (2006). Diabetes and mitochondrial function : Role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 212, 167–178.
- Rose, A. J., & Richter, E. A. (2005). Skeletal Muscle Glucose Uptake During Exercise: How is it Regulated? *Physiology*, 20, 260–270.
- Suarez, R. K., Herrera, L. G., & Welch, K. C. (2011). The sugar oxidation cascade : aerial refueling in hummingbirds and nectar bats. *The Journal of Experimental Biology*, 214, 172–178.
- Sjiiigren, B., Nordenskj, T., Holmgren, H., and Miillerstrijm, J., Arch. ges. Physiol., 240,427 (1938).
- Suarez, R. K., & Welch, K. C. (2017). Sugar Metabolism in Hummingbirds and Nectar Bats. *Nutrients*, 9(793), 1–16.
- Umminger, B. L. (1975). Body Size and Whole Blood Sugar Concentrations in Mammals. *Comp. Biochem. Physiol.*, 52A, 445– 458.
- Voigt, C. C., & Speakman, J. R. (2007). Nectar-feeding bats fuel their high metabolism directly with exogenous carbohydrates. *Functional Ecology*, 21(5), 913–921.
- Voigt, C., & Winter, Y. (1999). Energetic cost of hovering Flight in nectar-feeding bats (Phyllostomidae: Glossophaginae) and its scaling in moths , birds and bats. *J Comp. Physiol.*, 169, 38–48.
- Von Helversen, O., & Winter, Y. (2003). Glossophagine bats and their flowers: costs and benefits for plants and pollinators. In T. H. Kunz & M. B. Fenton (Eds.), *Bat Ecology* (pp. 346–397). Chicago and London.: University of Chicago Press.
- Wachtman, L. M., Kramer, J. A., Miller, A. D., Hachey, A., Curran, E., & Mansfield, K. G. (2012). Differential contribution of dietary fat and monosaccharide to metabolic syndrome in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Obesity*, 19(6), 1145–1156.

- Wasserman, D. H., Kang, L., Ayala, J. E., Fueger, P. T., & Lee-Young, R. S. (2011). The physiological regulation of glucose flux into muscle in vivo. *The Journal of Experimental Biology*, 214, 254–262.
- Welch, K. C., Allalou, A., Sehgal, P., Cheng, J., & Ashok, A. (2013). Glucose Transporter Expression in an Avian Nectarivore: The Ruby-Throated Hummingbird (*Archilochus colubris*). *PLoS ONE*, 8(10), 1–10.
- Welch, K. C., Herrera M., L. G., & Suarez, R. K. (2008). Dietary sugar as a direct fuel for flight in the nectarivorous bat *Glossophaga soricina*. *Journal of Experimental Biology*, 211(3), 310–316.
- Wilhelm, D., Luiz, S., Luiz, A., & Boveris, A. (2007). Antioxidant defenses , longevity and ecophysiology of South American bats. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 146, 214–220.
- Zinker, B. A., Lacy, D. B., Bracy, D., Jacobs, J., & Wasserman, D. H. (1993). Regulation of Glucose Uptake and Metabolism by Working Muscle An In Vivo Analysis, 42, 956–965.